

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
博 士 后 研 究 工 作 报 告

\_\_\_\_\_  
兰花生殖生物学研究

\_\_\_\_\_  
——雄配子体发育观察及精细胞、胚囊、合子、胚分离操作

姓 名      伍成厚

工作完成日期                      2008 年 11 月

报告提交日期                      2008 年 11 月

厦 门 大 学

2008 年 11 月

# 兰花生殖生物学研究

——雄配子体发育观察及精细胞、胚囊、合子、胚分离操作

## REPRODUCTIVE BIOLOGY OF ORCHIDACEAE

---THE FORMATION OF MALE GAMETOPHYTES AND THE ISOLATION OF  
SPERM CELLS, EMBRYO SACS, ZYGOTES AND EMBRYOS

博 士 后 姓 名 伍成厚

流动站（一级学科）名称 厦门大学生物学

专 业（二级学科）名称 植物学

研究工作起始时间 2004 年 7 月 8 日

研究工作期满时间 2008 年 11 月 20 日

厦 门 大 学

2008 年 11 月

## 内 容 摘 要

本文以五唇兰、蝴蝶兰为材料,应用石蜡切片和花粉压片观察了 2 种兰花雄配子体的发育,进行了精细胞的分离;在分离生活胚囊的基础上,进行了卵细胞、合子和多细胞胚的分离研究。

本文的主要结论是:

1. 五唇兰、蝴蝶兰的小孢子四分体均有四面体型、左右对称形、交叉形和 T 形等多种类型,它们发育成四合花粉,并由四合花粉聚集成花粉块。花粉成熟时为二细胞型。

2. 通过人工授粉使花粉管在子房内发育,再利用花粉管在甘露醇中直接爆破分离出五唇兰、蝴蝶兰的精细胞,成对的 2 个精细胞在体积大小、荧光强弱均显示有较大差异。应用显微操作仪可收集精细胞群体。

3. 应用酶解-振荡法处理胚珠,分离出 2 种兰花的生活胚囊,继之以显微解剖分离出 2 种兰花的合子和系列原胚,但 2 种兰花卵细胞均未分离出来。

4. 分离成熟胚则不需要酶解,仅用解剖法即可。

**关键词:** 兰花; 精细胞; 胚囊; 合子; 胚; 分离操作

## Abstract

Based on the materials of *Doritis pulcherrima* and *Phalaenopsis* hybrid, the development of male gametophytes were observed by the methods of paraffin sections and pollen compression. The isolation of sperm cells, living embryo sacs, egg cells, zygotes, and proembryos in these two kinds of orchid were studied. Results presented in this thesis can be summarized as follows:

-The microspore tetrads are tetrahedral, isobilateral, decussate, T-shaped and remain in massulae. At mature stage the pollen grains are 2-celled.

-Pollen tubes were induced in the ovary after manual pollination and sperm cells were isolated from the tubes by immediate blow up in a broken solution containing 5% ~12% mannitol. The two sperm cells isolated were dimorphism: one is big and the other is small, and the fluorescent intensity was distinctly. The two sperm cells can be divided into two individual groups by using a micromanipulator.

- Living embryo sacs could be isolated by manual microdissection from ovules after a pretreatment of combining enzymatic maceration with shaking, but egg cells were not isolated in the experiments.

-Zygotes and pre-embryos could be isolated by manual microdissection combined with enzymatic maceration to the ovules. The isolation of mature embryos need not enzymatic treatment.

Keywords: Orchidaceae, sperm cell, embryo sac, zygote, Embryo, isolation.

---

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的  
研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表  
的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规  
范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )  
课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)  
经费或实验室的资助,在( )实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,  
未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

200 年 月 日

## 厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（√）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：2008 年 11 月 20 日

导师签名：

日期：2008 年 月 日

## 英文缩写词表

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-二氯苯氧乙酸
ABA	Absciscic acid	脱落酸
B5	Gamborg <i>et al.</i> medium (1968)	B5 培养基
BA	Benzyladenine	6-苄氨基嘌呤
cDNA	Complementary Deoxyribo Nucleic Acid	互补 DNA
cm	centimeter	厘米
d	day	天
DAPI	4,6-diamidino-2-phenyl indole	4,6-二氨基-2-苯基吲哚
FDA	fluorescein diacetate	荧光素二醋酸酯
FCR	Fluorochromatic reaction	荧光染料反应
GA <sub>3</sub>	Gibberellin A <sub>3</sub>	赤霉素
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GUS	β-Glucuronidase	β-葡萄糖苷酸酶
h	hour	小时
IAA	Indole-3-acetic acid	吲哚-3-乙酸
IBA	Indole-3-butyric acid	3-吲哚丁酸
KT	Kinetin	6-糠基氨基嘌呤
L	litre	升
mg	milligram	毫克
min	minute	分钟
ml	millilitre	毫升
MS	Murashige & Skoog medium(1962)	MS 培养基
N6	朱至清,王敬驹,孙敬三,等(1974)	N6 培养基
NAA	Naphthalene acetic acid	α-萘乙酸
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
RT-PCR	reverse transcription-PCR	反转录-多聚酶链反应

T-DNA	Transferred DNA	转移 DNA
w	week	星期
ZT	Zeatin	玉米素

厦门大学博硕士论文摘要库



目 次	
内 容 摘 要 .....	I
ABSTRACT.....	II
厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明 .....	III
英文缩写词表 .....	IV
第一章 绪 论 .....	1
1.1 被子植物离体受精的研究概况 .....	1
1.2 研究方法和实验方案 .....	24
1.3 项目的评述 .....	26
第二章 兰花雄配子体发育的研究 .....	27
2.1 材料与方法 .....	28
2.2 五唇兰雄配子体发育的研究 .....	28
2.3 蝴蝶兰雄配子体发育的研究 .....	33
2.4 结论与讨论 .....	38
第三章 兰花花粉发育的观察 .....	39
3.1 材料与方法 .....	40
3.2 五唇兰生活花粉的观察 .....	40
3.3 蝴蝶兰生活花粉的观察 .....	45
3.4 讨论 .....	50
第四章 兰花精细胞分离的研究 .....	52

4.1 材料与amp;方法 .....	54
4.2 五唇兰授粉后花粉的发育 .....	55
4.3 五唇兰精细胞的分离 .....	58
4.4 蝴蝶兰授粉后花粉的发育 .....	61
4.5 蝴蝶兰精细胞的分离 .....	63
4.6 结论与amp;讨论 .....	67
<b>第五章 兰花胚囊与卵细胞的分离 .....</b>	<b>70</b>
5.1 材料与amp;方法 .....	71
5.2 五唇兰胚囊与卵细胞的分离 .....	72
5.3 蝴蝶兰胚囊与卵细胞的分离 .....	73
5.4 结论与amp;讨论 .....	75
<b>第六章 兰花合子与胚的分离 .....</b>	<b>78</b>
6.1 材料与amp;方法 .....	79
6.2 五唇兰合子与胚的分离 .....	80
6.3 蝴蝶兰合子与胚的分离 .....	84
6.4 结论与amp;讨论 .....	87
<b>第七章 结论与amp;讨论 .....</b>	<b>89</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>90</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>105</b>
<b>博士生期间发表的学术论文，专著 .....</b>	<b>106</b>

博士后期间发表的学术论文，专著 .....	106
个人简历.....	108
主要学习经历.....	108
主要工作经历.....	108
永久通信地址 .....	108

# 第一章 绪 论

## 1.1 被子植物离体受精的研究概况

被子植物的双受精是一个复杂的过程，由于是深藏在配子体内进行的，至今对其机理的认识还非常有限。离体受精技术是利用分离方法，将雌、雄配子置于离体控制条件下研究受精机理，可以排除体细胞组织的干扰，是目前植物生殖生物学最活跃的研究方向之一，不断有综述文章从不同角度总结这方面的研究成果<sup>[1-11]</sup>。植物离体受精包括三项技术基础，即配子分离、单对配子融合与人工合子的培养，这三个方面近年来都取得了丰富的研究成果。经过多年的发展，离体受精已经成为探索和利用被子植物有性生殖的一个技术平台，在研究精卵细胞的发育、配子识别、合子激活、进行远缘杂交以及结合基因工程技术开展植物育种等方面都具有独特的应用价值。

### 1.1.1 精细胞的分离

与动物和低等植物不同，被子植物的精细胞需要从花粉粒或花粉管中获取。被子植物的花粉有两种类型：三细胞花粉和二细胞花粉。三细胞花粉成熟时已经形成精子，可以由花粉粒中将精子分离出来。二细胞花粉在成熟时仅含生殖细胞和营养细胞，在花粉管萌发后生殖细胞进行分裂才形成精细胞，只能从花粉管获得精细胞。

三细胞花粉精细胞分离的方法主要是研磨法和渗透压冲击法，迄今已从数十种三细胞花粉植物的花粉中分离出了精细胞<sup>[1,6,12]</sup>。研磨

法，是将悬浮于一定介质中的花粉用玻璃匀浆器或其他装置轻轻研磨，使花粉壁破裂而释放精子。玉米 (*Zea mays* L.)<sup>[13]</sup>、油菜(*Brassica napus*)<sup>[13,14]</sup>、非洲菊 (*Gerbera jamesonii*)<sup>[15]</sup>、菠菜(*Spinacia oleracea* L.)<sup>[16]</sup>等曾用此法成功分离出精细胞。这一方法手续简便，不太依赖于花粉的成熟度与生理状况，但研磨时需要手工技巧，研磨后的花粉壁碎片较难除去<sup>[12]</sup>。渗透压冲击，是将花粉置于适宜的渗透压条件下，任其吸水后自行破裂。白花丹 (*Plumbago zeylanica*)<sup>[16]</sup>、玉米<sup>[14,18-23]</sup>、水稻 (*Oryza sativa* L.)<sup>[24-26]</sup>、黑麦(*Lolium perenne* L.)<sup>[27]</sup>等数十种三细胞花粉的精细胞分离采用这种方法都获得成功<sup>[6,12]</sup>。这种方法较少损伤精子，花粉壁较易过滤除去，但花粉的种类、发育时期、生理状况等因素对渗透压冲击的效果影响很大<sup>[12]</sup>。

莫永胜等<sup>[28]</sup>改良了原有的渗透压冲击法和研磨法，从紫菜苔 (*Brassica campestris* var. *purpurea*) 花粉粒中分离出大量生活精细胞，生活精细胞的分离率分别达到 34%和 86%，应用改良研磨法分离的精细胞在 4℃低温下最长可存活一周。

太子参 (*Pseudostellaria heterophylla* (Miq)) 除通过花粉直接爆破获得精细胞外，叶祖云等<sup>[29]</sup>应用花粉培养出花粉管再将花粉管进行爆破也可获得成对的精细胞，20 %的 PEG 有利于其花粉的萌发和花粉管的生长。水稻最近也通过培养花粉管爆破出精细胞<sup>[30]</sup>。白榆 (*Ulmus pumila* L.) 为三细胞花粉，采用研磨法不能分离出精细胞，而采用花粉管爆破法可以分离出成对的精细胞，牛血清白蛋白(BSA)有利于白榆精细胞的分离和保存而聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 不利于精细胞的分

离和保存<sup>[31]</sup>。由于精细胞在花粉管中有一个发育过程，分离出的精细胞更接近成熟状态，能更真实地反映出受精时的精细胞生理状态和特征，便于研究受精之前的精子状态。

二细胞花粉精细胞的分离方法也有两种：一为花粉离体培养法，花粉在培养基中人工萌发，待形成精子后，应用渗透压冲击或研磨使花粉管破裂。在百合（*Lilium davidii*）<sup>[32]</sup>和蓝猪耳（*Torenia fournieri*）<sup>[33]</sup>用此法分离出精细胞。这种方法萌发的花粉管在精细胞形成上常不同步，由此分离的精细胞群体中不免混杂一些尚未分裂的生殖细胞，使精细胞纯度降低<sup>[32]</sup>，而对于在人工培养基花粉管萌发后难以进一步生长的大花蕙兰（*Cymbidium hybridum*），则难以分离精细胞<sup>[34]</sup>。另一种方法是“活体-离体技术”（*in vivo-in vitro technique*）。Shivanna 等<sup>[35]</sup>1988 年首创此法，成功地分离了杜鹃（*Rhododendron macgregoriae*）和唐菖蒲（*Gladiolus gandavensis*）的精细胞：将授粉后体内生长一段时间的花柱培养在含硼和钙的培养基上，从花柱切口端长出的花粉管中已形成了一对精细胞，然后将花粉管转移到低渗透压溶液中应用渗透压冲击花粉管或用酶液处理花粉管，爆破的花粉管释放出一对精细胞。莫永胜等<sup>[36]</sup>用此法在 5 科 8 种具二细胞花粉的植物：鸢尾（*Iris tectorum* Maxim.）、棉花（*Gossypium hirsutum* L.）、朱顶红（*Hippeastrum vittatum* Herb.）、烟草（*Nicotiana tabacum* L.）、黄花菜（*Hemerocallis minor* Mill.）、萱草（*Hemerocallis julva* L.）、玉帘（*Zephyranthes candida* Herb.）、唐菖蒲分离出精细胞。后来在烟草<sup>[37-39]</sup>、蓝猪耳<sup>[40,41]</sup>等植物的精细胞沿用该法均获得很好的分离效果。

通过对精细胞的形态学研究,在烟草<sup>[42]</sup>、水稻<sup>[43]</sup>等数十种植物发现具有了雄性生殖单位(MGU)<sup>[44]</sup>,在许多植物分离的成对精细胞在形态和结构方面存在二型性<sup>[45-49]</sup>。在白花丹受精过程中,一对精细胞中质体较多的精细胞( $S_{ua}$ )基本上与卵细胞融合,而含线粒体较多的精细胞( $S_{vn}$ )主要是与中央细胞融合<sup>[50]</sup>。蓝猪耳成对精细胞体积较大的与营养核相连,体积较小的精细胞只与大精细胞连接<sup>[41]</sup>。离体玉米精细胞电泳可以区分为电泳迁移率有差异的2种类型<sup>[51]</sup>。但迎红杜鹃(*Rhododendron mucronulatum* Turcz.)<sup>[52]</sup>两个精细胞的细胞质中均含有丰富的细胞器,包括质体、线粒体、小泡及微管,内质网和高尔基体稀少,其两个精细胞中的类核数量无明显差异。

利用分离的精细胞可以开展精细胞特异蛋白研究<sup>[53-66]</sup>,构建精细胞 cDNA 文库<sup>[67-69]</sup>。从水稻精细胞 cDNA 文库中已经筛选出差异表达基因 RSG6<sup>[70,71]</sup>和 RSSG58<sup>[72,73]</sup>,进行了这2个基因启动子的克隆分析及表达载体构建<sup>[74,75]</sup>。随着显微操作仪的应用,除了可以收集大量而纯净的精子外,人们现在已经可以分别挑选出两个精细胞群体<sup>[39,67,76,77]</sup>,将有助于从精细胞 cDNA 文库中筛选出在精细胞特异表达的基因。利用分离的精细胞,还进行了玉米精细胞 RNA 和蛋白质的合成<sup>[78]</sup>、精细胞 B 染色体<sup>[79]</sup>,大麦(*Hordeum vulgare*)精细胞线粒体 DNA 的合成<sup>[80]</sup>等研究。

### 1.1.2 卵细胞的分离

目前分离被子植物卵细胞主要有3种方法:酶解法、解剖法和酶

解-解剖法。

### 1.1.2.1 酶解法

是以酶解为主要手段，辅以其他措施如吸打、压片等从分离的胚囊中获得卵细胞。Zhou 等<sup>[81]</sup>应用酶解法从金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.)、向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 和烟草分离出具有生活力的胚囊。胡适宜等<sup>[82]</sup>将烟草的新鲜胚珠酶解处理 3-3.5 h，再用酶解压片法可以分离出胚囊。当酶解时间延长至 4-8 h，胚囊周界壁被部分地消化，胚囊细胞的原生质体，包括卵细胞、助细胞、中央细胞和反足细胞的原生质体从珠孔端或合点端逸出，这是首例应用酶解法分离出烟草的卵细胞。

孙蒙祥等<sup>[83]</sup>应用酶解-渗透压冲击法显著地提高了分离烟草生活胚囊的效果，将收集的胚囊在含 10.5%-11.5%甘露醇配制的稀酶溶液中稍加振荡后静置，2 h 内可见游离出胚囊原生质体，往往反足细胞最先脱离，然后是中央细胞，最后是卵器。由于卵细胞原生质体通常略小于助细胞原生质体，易于从中识别卵细胞而加以挑选。傅纓等<sup>[84]</sup>将烟草胚珠酶解 3 h 后，以酶基液换去酶液，以自制微吸管轻压胚珠，使胚囊及其成员细胞从珠孔处逸出。分离胚囊细胞的生活力明显强于吸打后分离的细胞。Tian 等<sup>[37]</sup>利用较低浓度酶液从约 7000 个烟草胚珠分离出 269 个胚囊，再将胚囊转入新的酶液酶解 30 min 可以获得卵器的原生质体；而采用另一种方法即将胚囊转入无酶的低渗溶液虽可以分离出卵细胞，但分离的卵细胞因为吸涨厉害而不能用于精卵融



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库